- ## Resultado del LDH:

Una vez pasado el tiempo indicado, que fue en 60 segundos en el primero y en el segundo 120 segundos. El equipo llamado espectrofotómetro nos arroja un resultado final de LDH total para la muestra que realizamos:



TOTAL DE LDH: +588

- DISCUSIÓN DEL RESULTADO:

VALORES DE REFERENCIA:

TEMPERATURA	**37°**
VALORES NORMALES	230 a 450 UI

El valor de LDH de la muestra estudiada nos da un resultado de +588, el cual al hacer la comparación en relación a los valores normales podemos identificar que el LDH está elevado ya que no se encuentra en los valores normales. Un valor de LDH elevado puede ser un indicador de varios problemas médicos, ya que la enzima se libera cuando las células están dañadas o destruidas. Algunas causas de un aumento de LDH de debe a:

- Daño tisular o celular.
- Enfermedades del corazón.
- Enfermedades hepáticas.
- Cáncer.

CUESTIONARIO 1:

1. ¿A qué vía pertenece la LDH?

La lactato deshidrogenasa (LDH) pertenece principalmente a la vía metabólica de la glucólisis anaeróbica. La glucólisis es la ruta que convierte la glucosa en piruvato, y cuando las condiciones de oxígeno son limitadas (hipoxia), el piruvato se convierte en lactato a través de la acción de la LDH. Esta conversión es esencial porque regenera NAD^+, un cofactor necesario para que la glucólisis continúe produciendo ATP en condiciones anaeróbicas.

2. ¿Qué son isoenzimas?

Son proteínas con diferentes estructuras que catalizan la misma reacción o que trabajan con un mismo sustrato. Sin embargo, se desplazan de forma diferente en la electroforesis.

3. ¿Cuáles son las isoenzimas de la LDH y cuál es su distribución en los tejidos?

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima oxidorreductasa presente en el citoplasma de las células en la totalidad de los tejidos del cuerpo (1). Está formada por cuatro subunidades, las cuáles provienen de dos proteínas con conformaciones de aminoácidos totalmente distintas entre sí, teniendo una subunidad "M" y otra subunidad "H" (2).
Estas subunidades pueden combinarse en tetrámeros de 5 maneras (1,2):
- H4 y H3M1, halladas en el músculo cardiaco, eritrocitos y riñón.
- H2M2, que se encuentra en el pulmón y el páncreas.
- H1M3 y M4, se expresan en el hígado y el músculo.

¿Cuál isoenzima predomina en el corazón?

4. ¿Qué factores que afectan la actividad de la enzima determinada en el laboratorio?

Temperatura: La causa de la pérdida de estabilidad de la LDH en frío podría estar en la distinta termosensibilidad de las isoenzimas de la LDH. La LDH-4 y 5 son especialmente lábiles y posiblemente las responsables de la pérdida de actividad en frío. 4
En condiciones de aumento de la relación NADH / NAD +, como suele ocurrir en las personas que consumen bebidas alcohólicas, las altas concentraciones de etanol conducen a la producción de altas concentraciones de lactato y NADH y, por lo tanto, al agotamiento de NAD+. Esta reacción conduce posteriormente a la conversión de piruvato a lactato vinculado a la regeneración de NAD +. Por tanto, la alta relación NADH / NAD + desplaza el equilibrio de LDH hacia el lactato.

5. ¿Cuáles son las principales aplicaciones de la LDH en el diagnóstico médico?

Diagnóstico de infarto agudo de miocardio (IAM).
Detección de hemólisis.
Diagnóstico de enfermedades musculares.
Evaluación para enfermedades del hígado y ciertos cánceres.

PRUEBA 1:

Tubo 1:

Resultado Final: El tubo presenta ahora un líquido de tonalidad rojiza.

Interpretación: Aunque en ausencia de succinato se esperaría una mínima actividad enzimática, el cambio a un color rojizo sugiere que reacciones secundarias han alterado el estado del tinte. Esta transformación podría estar originada en reacciones de fondo propias del homogenizado que, aun sin la acción específica de la SDH, modifican la coloración del sistema.

Tubo 2:

Resultado Final: El tubo adquiere un tono rojizo.

Interpretación: La presencia del succinato permite que la SDH transfiere electrones durante la oxidación, lo que conduce a la reducción del indicador y a la transformación de su color inicial a un rojo ladrillo. La apariencia roja confirma que, en condiciones óptimas, se produce una reacción enzimática robusta, transformando el estado oxidado del tinte.

Tubo 3

Resultado Final: El tubo muestra un color final rojizo.

Interpretación: El malonato, al competir con el succinato, tiende a retardar la reacción enzimática. Sin embargo, el hecho de observar el resultado sugiere que, dado el tiempo de incubación utilizado, la competencia no impidió completamente la transferencia de electrones; simplemente pudo haber ralentizado la cinética de la reacción.

Tubo 4

Resultado Final: El líquido adquiere un tono azulado.

Interpretación: En este caso, el $HgCl_2$ impide la transferencia de electrones al unirse a un sitio alostérico, lo que bloquea la actividad de la SDH de forma eficaz. La ausencia de cambio hacia el rojo indica que el tinte no fue reducido,

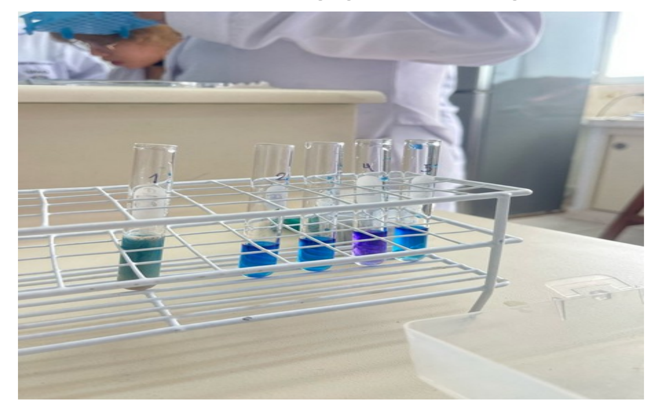
permaneciendo en el estado dominante del indicador oxidado. Este resultado confirma la potente acción inhibidora del bicloruro de mercurio y resalta que, en condiciones de inhibición no competitiva, la reacción enzimática se ve prácticamente anulada.

Tubo 5:

Resultado Final: El contenido del tubo presenta un tono verdoso.

Interpretación: En este sistema, el exceso de succinato actúa como un estímulo para la actividad enzimática, procurando superar en parte la acción competitiva del malonato. Sin embargo, la intervención del inhibidor no se desactiva completamente, lo que resulta en una reducción parcial del tinte. El color final verdoso, que se diferencia del rojo característico sugiere que la reacción se realizó de forma incompleta o intermedia, reflejando un balance entre actividad enzimática y bloqueo inhibidor.


INICIO DE LA PRUEBA:



FINAL DE LA PRUEBA:



PRUEBA 2:

Tubo 1 – Control (Sin Fracción Celular)

Componentes: Este tubo contiene el buffer, el indicador (por ejemplo, azul de metileno) y succinato, pero no se ha añadido material celular.

Observación Final: Se mantiene con un color azul (el color original del indicador).

Interpretación: La ausencia de cambio de color en este tubo demuestra que, sin la presencia de componentes celulares activos, el tinte permanece en su estado oxidado. Esto confirma que no existe reducción del indicador por acción enzimática ni reacciones de fondo relevantes. Sirve, por tanto, como base de comparación para evaluar la actividad en otras fracciones.

Tubo 2 – Fracción Nuclear
Componentes: Se ha incorporado la fracción nuclear.

Observación Final: El tubo mantiene un tono muy similar al azul del control, sin mostrar cambios cromáticos apreciables.

Interpretación: Dado que el núcleo celular no contiene mitocondrias ni la maquinaria necesaria para la respiración celular, no se esperaba que la actividad de la succinato deshidrogenasa ocurriera en este compartimento. La falta de cambio en la coloración confirma que la reducción del indicador es insignificante en la fracción nuclear, validando que la cadena respiratoria no se ubica en el núcleo.

Tubo 3 – Fracción Mitocondrial
Componentes: Este tubo contiene la fracción mitocondrial

Observación Final: Se observa un cambio considerable en el color, pasando de azul a un tono marrón claro. Este cambio indica una clara modificación cromática del indicador.

Interpretación: Las mitocondrias son el sitio donde se encuentra la cadena respiratoria, y en particular, la succinato deshidrogenasa actúa en la membrana interna. La actividad enzimática de esta fracción provoca la transferencia de electrones que reducen el tinte, produciendo un cambio de color pronunciado. Este resultado es el indicador de que la actividad respiratoria se concentra en las mitocondrias, confirmando la ubicación de la cadena respiratoria.

Tubo 4 – Fracción Microsomal
Componentes: Se añade la fracción microsomal.

Observación Final: El color final del tubo se mantiene muy cercano al azul original, sin un cambio significativo.

Interpretación: La fracción microsomal no contiene los complejos de la cadena respiratoria, por lo que la actividad de la succinato deshidrogenasa es mínima o inexistente en esta fracción. La ausencia de cambio en el color del indicador

refuerza la conclusión de que las mitocondrias son las responsables de la transferencia de electrones observada en el ensayo.

Tubo 5 – Fracción Soluble / Homogenizado Total

Componentes: En este tubo se encuentra el material soluble.

Observación Final: Se presenta un cambio de color intermedio, donde el tono varía de verde oscuro hacia un verde menos intenso

Interpretación: La fracción soluble puede incluir una cantidad reducida de mitocondrias o enzimas dispersas en el citosol, lo que resulta en una actividad enzimática moderada. La reducción parcial del indicador, evidenciada por el cambio intermedio de color, sugiere que si bien existe cierta actividad de la cadena respiratoria, ésta es mucho menor en concentración o eficacia respecto a la purificación obtenida en la fracción mitocondrial. Esto confirma que la mayor parte de la actividad respiratoria se localiza en las mitocondrias y que las demás fracciones contribuyen muy poco o de manera diluida a la reducción del tinte.

INICIO: FINAL:



CUESTIONARIO 2:

1. ¿Cómo se evidencia la actividad del succinato deshidrogenasa?

La succinato deshidrogenasa es una enzima que cataliza la oxidación del succinato a fumarato en el ciclo de Krebs, transfiriendo electrones a FAD, que se reduce a $FADH_2$. Esta reacción libera electrones que se pueden detectar mediante el cambio de color de un indicador redox, como el azul de metileno. El azul de metileno es de color azul cuando está en su forma oxidada, pero se reduce a una forma incolora al aceptar electrones. Este cambio de color indica la actividad enzimática.

2. ¿Cuál es el efecto del malonato de sodio?

El malonato es un inhibidor competitivo de la deshidrogenasa succinato, de tal manera que la presencia de malonato detiene el ciclo de Krebs. Al competir con el succinato por el sitio activo de la enzima, el maloto bloquea la conversión de succinato en fumarato. Detener el ciclo de Krebs implica parar la cadena respiratoria y por lo tanto la maquinaria de producción de ATP.

3. ¿El efecto del malonato es reversible?

Al ser un inhibidor competitivo su efecto puede revertirse aumentando la concentración del sustrato (succinato), lo que permite que el sustrato desplace al inhibidor del sitio activo. O sea, si aumenta la concentración de succinato, este desplaza al malonato del sitio activo, restableciendo la actividad enzimática.

4. ¿Cómo actúa el mercurio?

El mercurio actúa como un inhibidor irreversible de muchas enzimas al interactuar.

5. ¿Cuál es el rol del azul de metileno?

Este acepta los electrones y se reduce, permitiendo medir la reacción redox.

PRUEBA 3:

Tubo 1

Observación FINAL: El contenido del tubo se observa como un líquido claro; es decir, el tinte no ha sufrido transformación y conserva su estado original.

Interpretación: Al no incluir componentes celulares, en este tubo no se dispone de enzimas que transfieran electrones para reducir el p-fenilendiamina. La ausencia de cambio cromático sirve de línea base y confirma que el reactivo no sufre modificaciones en condiciones de fondo.

Tubo 2 – Fracción Nuclear

Observación Final: El líquido del tubo presenta un líquido claro. El color general se mantiene muy similar, sin una transformación cromática marcada.

Interpretación: El núcleo celular no contiene los complejos enzimáticos asociados a la cadena respiratoria. La ausencia de modificación significativa del tinte indica que no ocurre transferencia electrónica en la fracción nuclear, lo que es

congruente con la literatura y refuerza que la función respiratoria no se ejerce en el núcleo.

Tubo 3 – Fracción Mitocondrial

Observación Final: Este tubo exhibe un cambio cromático muy pronunciado, presentando un contenido en color oscuro, rojizo.

Interpretación: La fracción mitocondrial es la que alberga la cadena respiratoria en la membrana interna, donde se ubican enzimas como la succinato deshidrogenasa. La intensa reducción del p-fenilendiamina (reflejada en el cambio a color oscuro/rojizo) es indicativa de una elevada actividad oxidoreductora; es decir, una transferencia masiva de electrones. Este resultado confirma que la actividad enzimática responsable de la respiración se concentra en las mitocondrias.

Tubo 4 – Fracción Microsomal
Componentes:

Observación Final: El contenido del tubo presenta un tono "marrón claro"apenas diferente del estado original del indicador.

Interpretación: La fracción microsomal no posee la maquinaria de la cadena respiratoria. La casi invarianza del color, con cambios mínimos, indica que no se transfiere electrones de forma significativa en este compartimento. Así, la falta de actividad oxidoreductora refuerza que la cadena respiratoria NO se ubica en el retículo endoplásmico.

Tubo 5:
Observación Final: : El tubo muestra un contenido con un color "rosado intenso".

Interpretación: La fracción soluble está compuesta mayoritariamente por citosol, donde la actividad de la cadena respiratoria resulta muy baja. No obstante, pueden existir trazas o contaminación con mitocondrias que confieran una ligera actividad oxidoreductora. El cambio de color moderado (rosado) evidencia una reducción parcial del tinte, lo que se interpreta como un nivel residual de transferencia de electrones, muchísimo menor en intensidad que en la fracción mitocondrial pura.



CUESTIONARIO 3:

1. ¿Cuál es el rol del azul de metileno?

En nuestros ensayos se utiliza el azul de metileno como indicador redox. Esto significa que su color (generalmente azul) depende del estado de oxidación en el que se encuentre. Cuando una enzima transfiere electrones—por ejemplo, durante la oxidación del succinato en la cadena respiratoria—el azul de metileno se reduce (acepta electrones) y su color cambia o se decolora. De esta manera, observar el cambio cromático permite evaluar visualmente la actividad enzimática (o su inhibición) en el sistema estudiado.

2. ¿Cuál es el rol de la p-fenilendiamina?

En la prueba de fraccionamiento celular, en la que se busca ubicar la cadena respiratoria, la p-fenilendiamina actúa como un sustrato cromogénico para la actividad oxidoreductora. Algunas enzimas de la cadena respiratoria (como la citocromo oxidasa) oxidan la p-fenilendiamina, lo que provoca un cambio de color (por ejemplo, generando una tonalidad rojiza o marrón). Este cambio señala la presencia de actividad enzimática en la fracción analizada (especialmente en la fracción mitocondrial, donde reside la cadena respiratoria), permitiendo identificar aquella que tiene la capacidad de transferir electrones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

MedlinePlus . Prueba de lactato deshidrogenasa (LDH) [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. UU.; [actualizado el 28 de febrero de

2023; citado 2025 Abr 3]. Disponible en: https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-de-lactato-deshidrogenasa-ldh/Fuentes

Marcial-Reyes DB. Exploración a la EC. 1.1.1.27. Lactato Deshidrogenasa. [Tesis de Licenciatura]. Puebla, México: Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Biológicas; 2022. p. 4.
Montgomery R, Conway TW, Spector AA, MO. Bioquímica. Casos y texto. 6 ed. Iowa City, Iowa: Harcourt Brace de España, S.A.; 1998. p. 704.

Gómez López M, Rodríguez Roca N, Simón Velasco M, Alcaide Martín MJ, Soto AB, Gómez Rioja R. Estudio de la estabilidad de la actividad lactato deshidrogenasa en plasma a distintas temperaturas: conservación post-analítica. Adv Lab Med. 2020 May 19;1(4):20200025. Spanish. doi: 10.1515/almed-2020-0025. PMCID: PMC10197260.

López Villagra, Einer Joel y Ortiz Dávila, Abigail de los Ángeles (2022) Relación entre los niveles de la enzima deshidrogenasa láctica sérica y los trastornos de hipertensión durante el embarazo en mujeres de 18 a 40 años a partir de las 20 semanas de gestación del Hospital Amistad Japón-Nicaragua del departamento de Granada durante el primer semestre del año 2021. Licenciatura thesis, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

ScienceDirect. Succinate dehydrogenase. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergética, 2012. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/succinate-dehydrogenase

Martínez Guerra JJ. Algunos inhibidores. Libro Electrónico de Bioquímica [Internet]. Universidad Autónoma de Aguascalientes; [citado 2025 Abr 2]. Disponible en: https://libroelectronico.uaa.mx/capitulo-9-aspectos-importa/algunos-inhibidores.html

Explainedy. ¿Cómo inhibe el malonato la succinato deshidrogenasa? [Internet]. Explainedy; 2022 Oct 21 [citado 2025 Abr 2]. Disponible en: https://explainedy.com/como-inhibe-el-malonato-la-succinato-deshidrogenasa/

Schaller C. Tipos de inhibidores reversibles. LibreTexts Español [Internet]. 2019 [citado 2025 Abr 2]. Disponible en: https://espanol.libretexts.org/Quimica/Química_General/Estructura_y_Reactividad_en_Química_Orgánica,_Biológica_e_Inorgánica_III:_Reactividad_en_Química_Orgánica,_Biológica_e_Inorgánica_1/06:_Catálisis_enzimática/6.05:_Tipos_de_Inhibidores_Reversibles

Elles LS. Regulación Enzimática - Inhibición. LibreTexts Español [Internet]. 2019 [citado 2025 Abr 2]. Disponible en: https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Introductoria,_Conceptual_y_GOB/Mapa:*Fundamentos_de_Qu*

%C3%ADmica_General_Org%C3%A1nica_y_Biol%C3%B3gica(McMurry_et_al.)/
19:_Enzimas_y_Vitaminas/19.06:Regulaci%C3%B3n_Enzim%C3%A1tica-_Inhibici
%C3%B3n